

Appelsiininkuoren fenoliset uuteaineet

Josefiina Haarala
Kandidaatintutkielma
Kemian tutkinto-ohjelma
Oulun yliopisto
2020

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. APPELSIININKUORI JA UUTEAINEET	2
2.1. Polyfenolit	3
2.1.1. Fenolihapot.....	4
2.1.2. Flavonoidit	5
2.1.2.1. <i>Flavanonit</i>	5
2.1.2.2. <i>Flavonit</i>	6
2.1.2.3. <i>Flavonolit</i>	7
2.1.2.4. <i>Flavanolit</i>	7
3. UUTTOMENETELMÄT	9
3.1. Tavallinen kiinteä-nesteuutto.....	9
3.2. Ultraääniavusteinen uutto	13
3.3. Mikroaaltoavusteinen uutto	15
3.4. Yhteenvedo uuttomenetelmistä.....	18
4. FENOLISTEN UUTEAINEIDEN ANTIOKSIDANTTISUUS	20
4.1. Antioksidanttisuus	20
4.1.1. Antioksidanttiaktiivisuuden määrittäminen	21
4.2. Lääketeollisuus	23
4.3. Elintarviketeollisuus	25
5. YHTEENVETO	27
6. KIRJALLISUUSVIITTEET	29

1. JOHDANTO

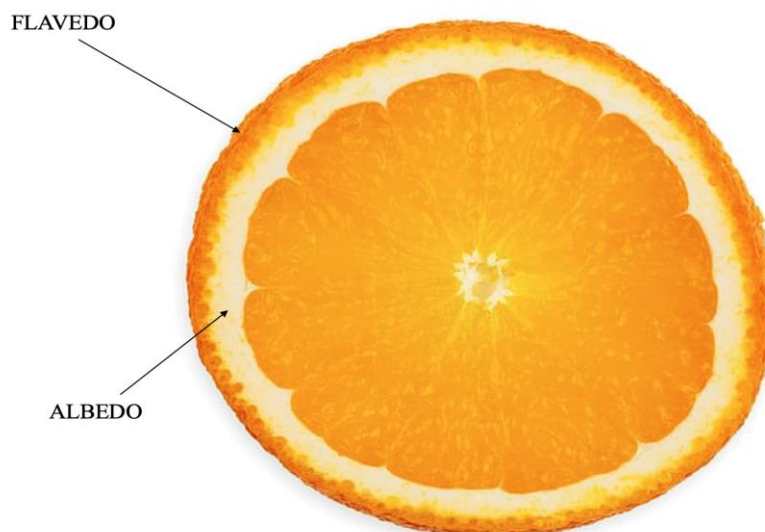
Appelsiini on yksi maailman suosituimmista hedelmistä. Vuosittain appelsiinia tuotetaan ympäri maailmaa yli 50 miljoonaa tonnia.¹ Pelkästään Espanjassa appelsiinin kokonaistuotanto oli sesongin 2018/2019 aikana reilu 3,7 miljoonaa tonnia.² Suuri osa tuotannosta on tarkoitettu hedelmämehun teolliseen valmistamiseen. Appelsiininkuori edustaa jopa puolta hedelmän massasta, joten appelsiinimehun tuotanto johtaa valtaviin määrin kuorijätettä.¹ Kuorijätettä on käytetty pääasiassa eläinten rehuna tai heitetty suoraan jätteenä ympäristöön ilman asianmukaista käsittelyä.³ Kuorijätteen käsittely on merkittävä ongelma hedelmämehuteollisuudelle, sillä suuret jätemäärät voivat olla hyvin haitallisia ympäristölle.¹

Appelsiininkuori sisältää runsaasti fytokeemikaaleja eli bioaktiivisia yhdisteitä, joita ei varsinaisesti voida pitää ravintoaineina, mutta joilla on ihmisen terveyttä edistäviä vaikutuksia. Kuori sisältää esimerkiksi hedelmän korkeimmat flavonoidipitoisuudet.⁴ Flavonoidit ovat appelsiininkuoressa esiintyvä polyfenolien ryhmä. Polyfenolien terveyttä edistävät vaikutukset perustuvat niiden kykyyn toimia antioksidanteina. Näitä vaikutuksia ovat esimerkiksi syövän ja tulehduksen vastaiset vaikutukset.⁵ Ottaen huomioon mehuteollisuuden kuorijätteen valtavan määrän, appelsiininkuoren fenoliyhdisteitä voitaisiin potentiaalisesti hyödyntää korkean lisäarvon tuotteina, esimerkiksi lääkeaineiden, funktionaalisten elintarvikkeiden tai luonnollisten antioksidanttien kehityksessä.^{5,6}

Jotta appelsiininkuoren fenoliyhdisteitä voitaisiin hyödyntää, täytyy ne saada eristettyä kuorimatriisista. Fenoliyhdisteiden talteenotossa hyödynnetään kemiallisista erotusmenetelmistä uuttoa. Tässä tutkielmassa tarkastellaan appelsiininkuoren koostumusta ja sen polyfenoleita. Lisäksi perehdytään tarkemmin kolmeen fenoliyhdisteiden eristämisessä käytettyyn uutomenetelmään, tavalliseen kiinteä-nesteuuttoon, ultraääniavusteiseen uuttoon sekä mikroaltoaavusteiseen uuttoon. Lopuksi käsitellään lyhyesti polyfenolien antioksidanttivaikutusta sekä tutustutaan lääke- ja elintarviketeollisuuden sovellusmahdollisuuksiin, joissa tätä vaikutusta voidaan hyödyntää.

2. APPELSIININKUORI JA UUTEAINEET

Appelsiinipuu (*Citrus sinensis*) on *Rutaceae* -sukuun kuuluva sitrushedelmäkasvi, joka on levinnyt laajalti trooppisella ja subtrooppisella alueella.⁵ Kaikkia näiden kasvien hedelmiä yhdistää makea ja hapan maku. Appelsiini on erittäin ravitseva ja runsaasti mineraaleja, proteiinia, hiilihydraatteja sekä rasvaa sisältävä hedelmä.⁷ Hedelmälihan lisäksi appelsiini sisältää siemeniä sekä hedelmää ympäröivän kuoren. Kuori edustaa noin puolta hedelmän massasta.⁸ Se voidaan jakaa kuvan 1 mukaisesti ulompaan värilliseen pintaan eli flavedoon ja valkoiseen pehmeään sisäkerrokseen eli albedoon. Flavedo koostuu pääosin parenkymaattisista soluista eli kasvien perussoluista, kutikulasta sekä epi-kutikulaarisesta vahasta. Kutikula on kuoren pinnalla oleva kutiini-seoksesta koostuva ohut kerros. Epi-kutikulaarisella vahalla tarkoitetaan kutikulan ulkopintaa peittävää vahapinnoitetta, joka sisältää öljyrauhasia. Albedo taas koostuu putkimaisista soluista, jotka yhdistyessään muodostavat kudossmassan.⁵



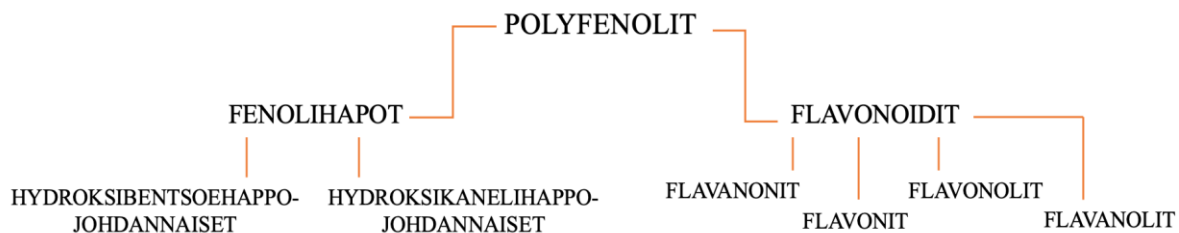
Kuva 1. Appelsiininkuoren rakenne

Appelsiinikuoren tarkka kemiallinen koostumus vaihtelee ja siihen vaikuttavat lajike, kasvuolosuhteet, juurakko, kypsyysaste sekä ilmasto. Karkeasti kuori koostuu liukoisista sokereista (16,90 %), tärkkelyksestä (3,75 %), kuiduista (63,05 %), hivenaineita sisältävästä tuhkasta (3,50 %), rasvoista (1,95 %) ja proteiineista (6,50 %) sekä pienestä määrästä muita komponentteja (4,35 %). Kuidut voidaan tarkemmin jakaa selluloosaan (9,21 %), hemiselluloosaan (10,50 %), ligniiniin (0,84 %) ja pektiiniin (42,50 %). Kaikissa prosenttimäärissä viitataan osuuteen kuoren kuivapainosta.¹ Appelsiininkuoren kosteuspitoisuus on noin 70-80 %.⁹

Uuteaineita ovat ne kuoren yhdisteet, jotka liukenevat kuorimassasta veteen sekä poolittomiin tai poolisiin orgaanisiin liuottimiin. Appelsiininkuoren rasvoista käytetään yleisemmin ilmaisu-eteerinen öljy, joka koostuu pääosin terpeeneistä, terpenoideista, aldehydeistä ja ketoneista. Öljyn tärkein yhdiste on terpeeneistä limoneeni, joka edustaa noin 95 prosenttia kokonaismäärästä. Eteerisen öljyn lisäksi liukoisten sokerien, tärkkelyksen ja pektiinin eristämisessä kuoresta käytetään erilaisia uutomenetelmiä, joten näitä yhdisteitä voidaan pitää uuteaineina.¹ Lisäksi appelsiininkuoren uuteaineisiin kuuluu pienemmillä pitoisuuksilla esiintyviä yhdisteitä, joita ovat esimerkiksi polyfenolit, karotenoidit, C-vitamiini, alkaloidit sekä orgaaniset hapot. Näistä esimerkiksi C-vitamiinia on todettu olevan kuoressa enemmän kuin hedelmäme-¹⁰hussa. Tässä tutkielmassa ei kuitenkaan käsitellä vitamiinien tai hiilihydraattien kaltaisia uutettavia ravintoaineita vaan keskitytään paljon terveysvaikutuksia omaavien fyto-¹⁰kemikaalisten polyfenolien eli fytolenolien tarkempaan tarkasteluun.

2.1. Polyfenolit

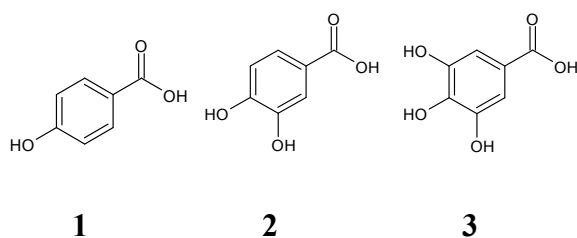
Fenolit ovat luonnossa kasvikuodoksissa esiintyviä yhdisteitä, joiden rakenteessa esiintyy fenoliyksikkö eli aromaattinen rengas, johon on liittynyt vähintään yksi hydroksyyli-¹¹substituuentti. Polyfenoleilla näitä fenoliyksiköitä on useampia. Niiden tärkeimmät ravintolähteet ovat hedelmät, vihannekset sekä kasviperäiset juomat, kuten hedelmäme-¹²hut ja tee. Appelsiininkuoren polyfenolien kokonaismäärä on huomattavasti korkeampi kuin kuorittujen hedelmien polyfenolipitoisuus.¹⁰ Polyfenolit ovat kasvien metaboliitteja eli aineenvaihduntatuotteita ja kuoressa niiden tehtävänä on suojata hedelmää liialliselta UV-säteilyltä sekä taudinaiheuttajilta.⁵ Polyfenolit eivät ole vitamiinien tapaan varsinaisia ravintoaineita mutta niillä on paljon ihmiselle hyödyllisiä terveysvaikutuksia. Kuten kuoren koostumukseen myös polyfenolien määrään ja koostumukseen vaikuttavat hedelmän kasvu-¹³ympäristö ja -olosuhteet sekä kypsyyssaste. Polyfenoleja esimerkiksi tuotetaan auringonvalon avulla, joten valon määrä vaikuttaa niiden pitoisuuteen. Appelsiininkuoriuutteen polyfenoleja käsiteltäessä, jaetaan ne karkeasti kahteen fenyylipropanoideista johdettavaan luokkaan, fenoli-¹³happoihin ja flavonoideihin. Kuvan 2 kaaviokuva esittää tarkemmin, miten fenoli-¹³hapot ja flavonoidit jaetaan alaluokkiin.

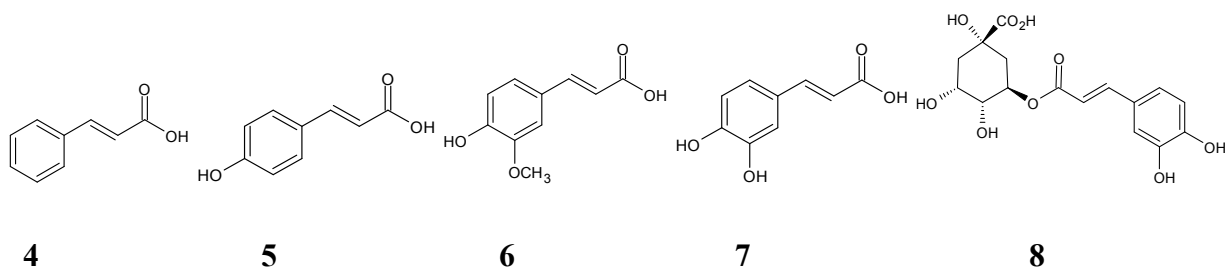


Kuva 2. Kaaviokuva appelsiininkuoren polyfenolien jaosta eri luokkiin

2.1.1. Fenolihapot

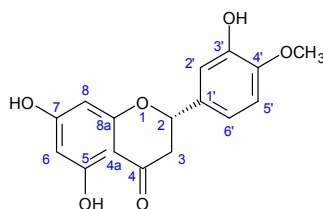
Yleisesti termillä ”fenolihapot” tarkoitetaan yhden karboksyyli-ryhmän omaavia fenoleja. Tässä tapauksessa kasvien metaboliiteista eli aineenvaihduntatuotteista puhuttaessa tarkoitetaan kuitenkin erillistä orgaanisten happojen ryhmää. Tämä fenolihappojen ryhmä voidaan jakaa hydroksibentsoehappojohdannaisiin ja hydroksikanelihappojohdannaisiin, joilla on toisistaan selvästi poikkeavat hiilirakenteet. Hydroksibentsoehappojohdannaisissa aromaattisen renkaan yhteen hiileen on liittynyt orgaanisille hapoille tunnusomainen karboksyyli-ryhmä. Hydroksikanelihappojohdannaisissa aromaattiseen renkaaseen on vastaavasti liittynyt tyydyttymätön kahden hiilen ketju, jonka päässä on karboksyyli-ryhmä. Molemmissa rakenteissa aromaattisen renkaan muihin hiiliin on liittynyt vaihtelevasti vetyjä sekä hydroksyyli- ja metoksiryhmiä. Hydroksyyli- ja metoksiryhmien lukumäärä ja sijainti renkaassa tekevät eron eri fenolihappojen välillä. Vain pieni osa fenolihapoista on hedelmässä vapaassa happomuodossa. Suurin osa hapoista on yhdistynyt ester-, eetteri- tai asetaalisidoksella johonkin muuhun yhdisteeseen, kuten selluloosaan, terpeeniin, proteiiniin tai glukoosiin. Alla on esitetty appelsiininkuoren kolmen hydroksibentsoehappojohdannaisen, *p*-hydroksibentsoehapon (1), protokatekiinihapon (2) ja gallushapon (3) sekä viiden hydroksikanelihappojohdannaisen, *trans*-kanelihapon (4), *p*-kumaarihapon (5), ferulahapon (6), kahvihapon (7) ja klorogeenihapon (8) rakenteet.¹¹





2.1.2. Flavonoidit

Flavonoidit ovat merkittävän appelsiininkuoresta eristettävien polyfenolien alaryhmä.¹⁴ Sitruhedelmistä on tunnistettu yli 60 erityyppistä flavonoidia.¹⁵ Flavonoidien perusrakenne koostuu 15 hiiliatomista. Rakenteessa kaksi bentseenirengasta on liittynyt yhteen lineaarisella kolmen hiilen ketjulla, kuten hesperetiinin (**9**) rakenteessa hiilten C-2, C-3 ja C-4 välityksellä. Lisäksi rakenteessa on happisilta C-2 ja C-8a-asemien välillä. Sitruhedelmissä esiintyy yleisesti kolmen tyyppisiä flavonoideja, joita ovat flavanonit, flavonit ja flavonolit. Nämä flavonoidit omaavat yhteisen fenyyl-bentsopyroni rakenteen, jossa karbonyyliryhmä on liittyneenä C-asemaan eli O-1-happiatomiin nähden vastakkaiseen *para*-asemassa olevaan C-4-hiileen.¹⁴ Sitruhedelmissä esiintyy myös rakenteeltaan edellä esitetyistä flavonoideista poikkeavia flavanoleja, mutta ne eivät ole sitruhedelmille erityisiä yhdisteitä, sillä niitä saadaan eristettyä suurempina pitoisuuksina muista kasviksista.¹⁵

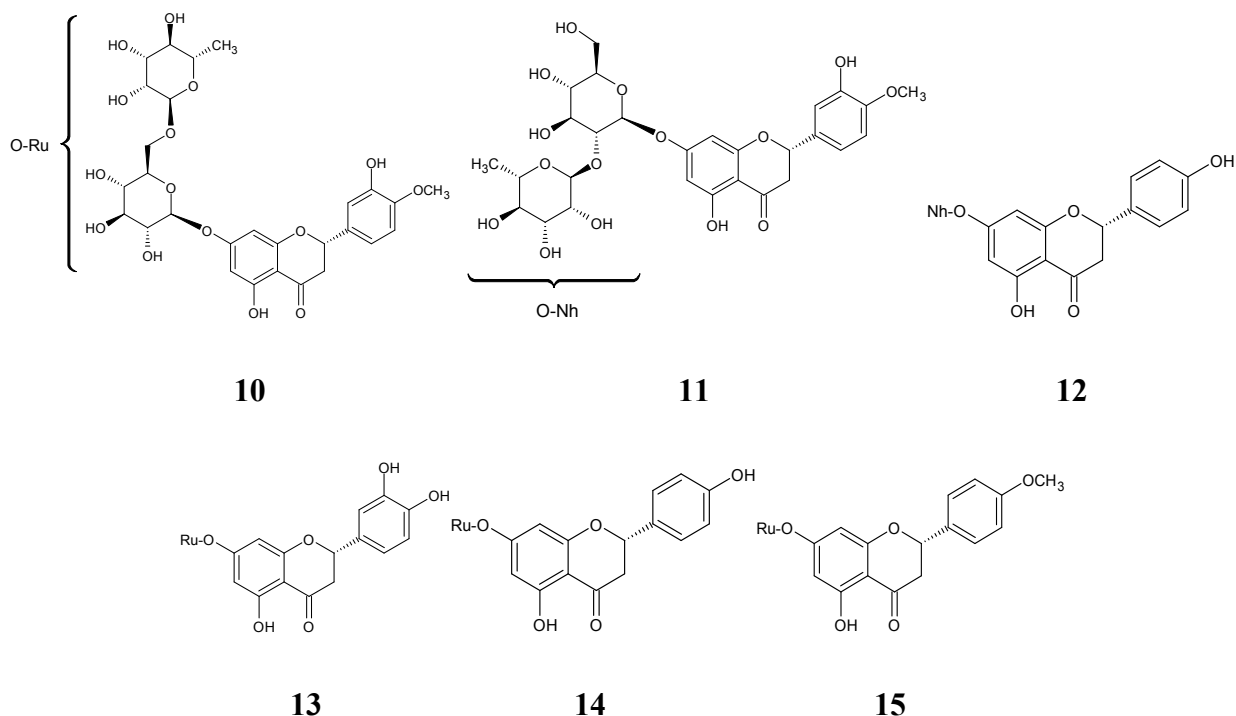


9

2.1.2.1. Flavanonit

Flavonoideista hallitsevin ryhmä on flavanonit, jotka voidaan jakaa vapaisiin flavanoneihin ja flavanoniglykosideihin. Sitruhedelmäflavanonit esiintyvät luonnossa tyypillisesti glykosideina, joten näiden lukumäärä ja pitoisuus on paljon vapaita flavanoneja korkeampi. Flavanonien yhtenäinen runko muodostuu fenyyl-bentsopyroni rakenteesta. Vapailla flavanoneilla rungossa sijaitsee kaksi hydroksyyliiryhmää C-5 ja C-7-asemissa. Flavanoniglykosideissa flavanonit on glykosyloitu disakkaridilla, joko neohesperidoosilla (Nh) tai rutinoosilla (Ru), tavallisesti C-7-asemaan.¹⁶ Disakkaridiin perustuen flavanoniglykosidit voidaan siis jakaa neohesperidosideihin ja

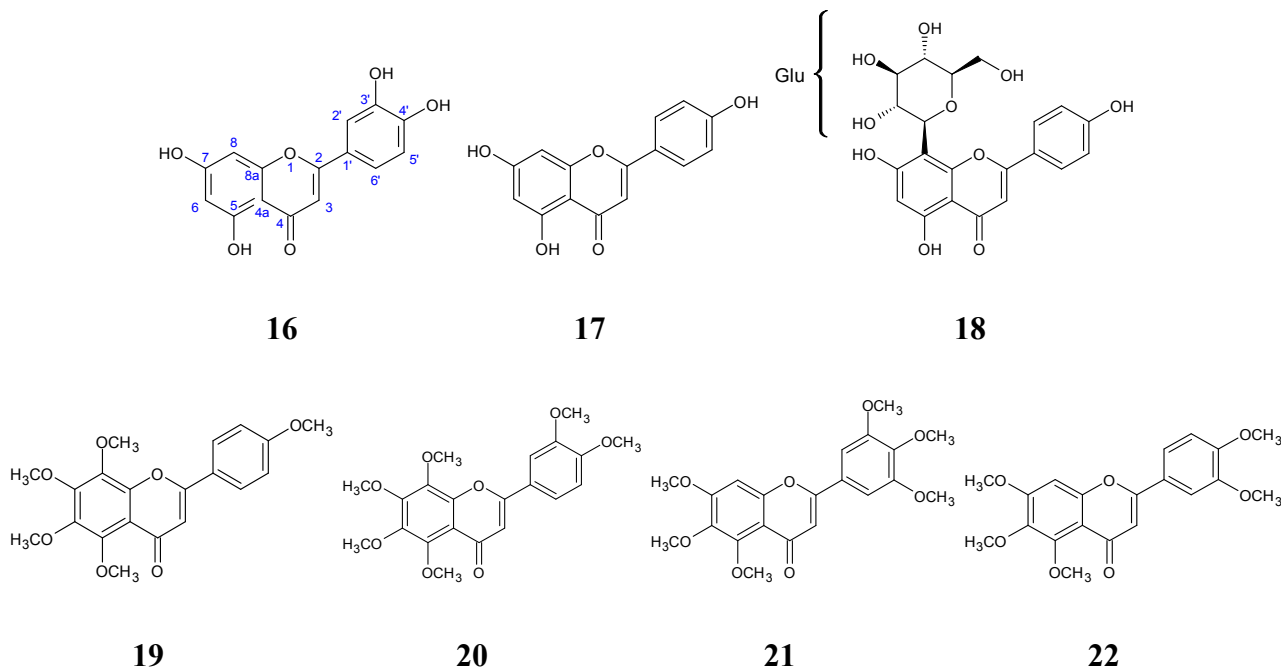
rutinosideihin.¹⁷ Appelsiininkuoren vapaan flavanonin, hesperetiinin (**9**) lisäksi kuoressa esiintyy kuutta alla esitettyä flavanoniglykosidia, hesperidiinia (**10**), neohesperidiinia (**11**), naringiinia (**12**), eriositriinia (**13**), narirutiniä (**14**) ja didymiinia (**15**).



2.1.2.2. Flavonit

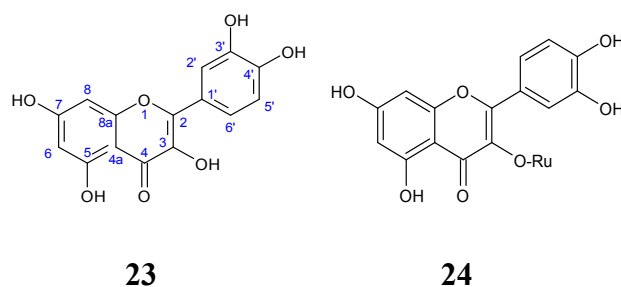
Flavanonien jälkeen seuraavaksi hallitsevin ryhmä on flavonit ja sen glykosidit. Flavonien rakenteessa C-2 ja C-3-asemien välillä on kaksoissidos. Flavonien tapauksessa glykosidien yleisimpiä sokeriosia ovat glukoosi (Glu), rutinoosi (Ru) ja neohesperidoosi (Nh). Flavoniglykosidien kaksi päämuotoa ovat O- ja C-glykosidit. O-glykosideissa sokeriosa on kiinnittynyt flavonin hiilirunkoon happiatomin välityksellä ja C-glykosideissa vastaavasti hiiliatomin välityksellä. C-glykosylointi voi tapahtua joko C-6 tai C-8-asemaan kun taas O-glykosylointi tapahtuu C-7-asemaan. Glykosylaatio voi tapahtua samanaikaisesti näissä asemissa eri sokeriyhdistelmillä. Tästä johtuen sitrushedelmissä on havaittu, mono-C/O-glykosideja lukuun ottamatta, suuria määriä erilaisia flavoni-di/tri-glykosideja.¹⁶ Polymetoksyloiduiksi flavoneiksi eli PMF-yhdisteiksi kutsutaan flavoneita, joissa perusrakenteeseen on liittynyt kaksi tai useampia metoksiryhmiä. Vaikka PMF-yhdisteiden pitoisuudet ovat flavonien pitoisuuksia pienempiä, pidetään PMF-yhdisteitä joskus omana flavonoidiryhmänä niiden erityisestä rakenteesta ja korkeasta biologisesta aktiivisuudesta johtuen.¹⁸ Seuraavaksi on esitetty appelsiininkuoren kahden vapaan flavonin, luteoliinin (**16**) ja apigeniinin (**17**) sekä flavoniglykosidi viteksiinin (**18**) rakenteet.

Lisäksi on esitetty neljän PMF-yhdisteen, tangeretiinin (**19**), nobiletiinin (**20**), 5,6,7,3',4',5'-heksametoksiflavinon (**21**) sekä sinensetiinin (**22**) rakenteet.



2.1.2.3. Flavonolit

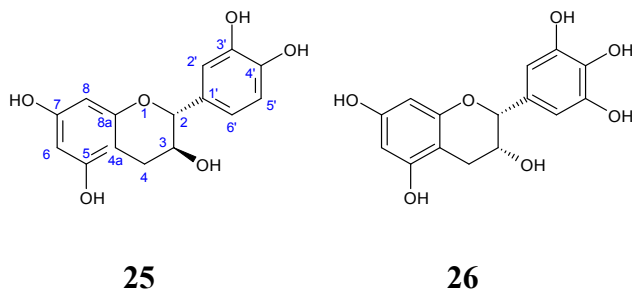
Kolmannen ryhmän flavonoidien eli flavonolien pitoisuudet ovat paljon flavanonien ja flavonien pitoisuuksia pienempiä. Flavonolien rakenteessa C-2 ja C-3-asemien välillä olevan kaksoissidoksen lisäksi C-3 asema on hydroksyloitunut. Flavonoliglykosideissa flavonolit on O-glykosyloitu joko glukoosilla (Glu) tai rutinoosilla (Ru), C-3 tai C-7-asemaan. On mahdollista, että glykosylointi tapahtuu samanaikaisesti molempiin asemiin.¹⁶ Alla on esitetty appelsiininkuoren vapaan flavonolin, kversetiinin (**23**) ja flavonoliglykosidin, rutiinin (**24**) rakenteet.



2.1.2.4. Flavanolit

Neljäs ja viimeinen appelsiininkuoren flavonoidiryhmä on flavanolit. Flavanolien rakenne poikkeaa huomattavasti edellä esitettyjen flavonoidiryhmien rakenteista, sillä siinä ei esiinny karbonyyliryhmää. Sen sijaan flavanoleissa kuitenkin C-3 asema on hydroksyloitunut flavonolien

tapaan.¹⁵ Alla on esitetty kahden appelsiininkuoren flavanolin, katekiinin (**25**) ja epigallokatekiinin (**26**) rakenteet.¹¹



Edellä esitetyistä erilaisista flavonoideista erityisiä ovat etenkin flavanoniglykosidit ja polymetoksyloidut flavonit, sillä näitä yhdisteitä esiintyy vain sitrushedelmissä.¹⁹ PMF-yhdisteitä esiintyy etenkin appelsiineissa, tangeriineissa ja sitruunoissa. Flavanoniglykosideista rutinosidit ovat mauttomia ja esiintyvät pääasiassa appelsiineissa, kun taas neohesperidosidit ovat kitkerän makuisia ja esiintyvät appelsiinissa pienemmillä pitoisuuksilla.²⁰ Flavanonien diglykosidimuodot taas antavat tyypillisen maun sitrushedelmille.¹⁵ Flavonoideista flavanonien pitoisuus on suurempi sitrushedelmäkuoren albedossa, kun taas flavoneita ja flavonoleja esiintyy pääosin kuoren flavedossa.¹⁰

3. UUTTOMENETELMÄT

Uutto tarkoittaa yhdisteiden erilaisiin liukoisuusominaisuuksiin perustuvaa kemiallista erotusmenetelmää, jossa analysoitavat uuteaineet pyritään erottamaan appelsiininkuoren solumatriisista.⁴ Uttaminen on päävaihe bioaktiivisten uuteaineiden talteenotolle ja eristämiseksi kasvimateriaaleista ennen analyysia.⁵ Samalla se on myös haastava vaihe, raaka-aineiden sekä kiinnostavien molekyylien herkkyyden vuoksi. Sitrushedelmien kuoret ovat esimerkiksi herkkiä biokemialliselle ja mikrobiologiselle hajoamiselle. Jotkut fenoliyhdisteet taas ovat herkkiä kuumuudelle.⁹ Ihanteellisen uuttomenetelmän tulisi olla kvantitatiivinen, aikaa säästävä ja sellainen, että se ei tuhoa näytettä.⁴

Ennen appelsiininkuoren uuttoprosessia kuorelle suoritetaan lähes poikkeuksetta esikäsittely. Esikäsittelyvaiheet koostuvat tavallisesti hedelmän pesusta ja kuorinnasta, kuoren kuivattamisesta, jauhamisesta, seulomisesta ja varastoinnista. Erityisesti kuivatus ja jauhamisessa määrätty partikkelikoko vaikuttavat uuttoprosessiin ja saataviin fenolipitoisuuksiin. Kuivatus ei ole pakollinen vaihe mutta yleensä veden poistaminen kuorista lisää kuorimatriisin huokoisuutta ja helpottaa sitoutuneiden fenoliyhdisteiden vapautumista. Lisäksi se ehkäisee appelsiininkuoren pilaantumista. Toisaalta kuivatus voi myös tuhota fenoliyhdisteitä hapen, liian korkean lämpötilan tai liian pitkän kuivatusajan vuoksi, joten uuttosaanto riippuu kuivatusolosuhteista. Kuivatus voidaan toteuttaa esimerkiksi uuni-, ilma-, aurinko- tai kylmäkuivauksella eli jäädyttämällä kuori ja kuivaamalla sitten sublimaation avulla vakuuissa. Mahdollisen kuivatusvaiheen jälkeen kuori joko pilkotaan tai jauhetaan liuottimen ja kuorimatriisin välisen kosketuspinnan lisäämiseksi.⁹ Pilkotun tai jauhettun kuoren seulonnalla varmistetaan, että vain halutun partikkelikoon omaavat kuoripalat tai -jauhe uutetaan.⁴

3.1. Tavallinen kiinteä-nesteuutto

Tavallinen liuotinuutto on fenoliyhdisteiden yleisin uuttomenetelmä.⁹ Luonnonaineita eristettäessä kyseessä on tarkemmin kiinteä-nesteuutto, missä esikäsitelty pilkotut appelsiininkuoripalat tai kuorijauhe uutetaan sopivaa uuttoliuotinta käyttäen.⁴ Menetelmän optimoimiseksi on otettava huomioon seuraavat toimintaparametrit: orgaanisen liuottimen tyyppi ja tilavuusosuus mikäli kyseessä on liuotinseos, kuorimateriaalin ja liuottimen suhde, uuttoaika, lämpötila sekä uuttosyklien lukumäärä. Uutto toistetaan lähes aina kaksi tai kolme kertaa.^{9,11} Uuttoliuottimen poolisuudella on suuri vaikutus saadun uutteen fenoli- ja antioksidanttipitoisuuksiin. Fenoliyhdisteet ovat poolisia yhdisteitä, joten ne liukenevat paremmin poolisiin liuottimiin, kuten metanoliin. Metanoli on

kuitenkin myrkyllinen yhdiste, joten kuoren fenoliyhdisteiden hyödyntämisen kannalta on järkevämpi käyttää ympäristöystävällisempiä ja elintarvikelaatuisia liuottimia, kuten etanolia tai asetonia.⁵ Etenkin fenolihapot ovat erittäin poolisia yhdisteitä ja niiden uuttaminen pelkästään orgaanisilla liuottimilla on siksi hankalaa. Tällöin suositetaan liuotinseoksia, esimerkiksi alkoholi-vesi- tai asetoni-vesi-seoksia.¹¹ Toisaalta veden lisääminen etanoliin lisää polyfenolien uuttosaantoa mutta samalla muiden yhdisteiden uuttuminen kasvaa, jolloin fenolien suhteellinen osuus uutteen pienenee.⁵

Tavallista liuotinuuttoa käytettäessä on saatu asetoni-vesi- tai etanoli-vesi-liuotinseosta käyttäen optimiolosuhteissa taulukon 1 mukaisia pitoisuuksia eri fenoliyhdisteille. Taulukon ensimmäisessä tutkimuksessa B. Nayak tutkimusryhmineen⁴ käyttivät algerialaisen appelsiinin koko kuorta. Esikäsittelynä pesty kuori kuivattiin 40 °C:ssa vakiopainoon sekä jauhettiin ja seulottiin siten, että kuorijauheen partikkelikoko oli alle 125 µm. Esikäsitelty kuorijauhe varastoitiin ilmatiiviissä pussissa 4 °C:ssa. Kuorijauhetta uutettiin massa-tilavuussuhteella 1:50 (g/ml) 60 °C:ssa vesihauteessa kahden tunnin ajan, samalla ravistaen nopeudella 110 ravistusta minuutissa. Uuttoliuottimena käytettiin 50 % asetoni-vesiseosta. Saatu uute suodatettiin Büchner-suodatuksella, käyttäen Whatman No 1. suodatinpaperia. Suodatettu uute analysoitiin HPLC-menetelmällä eli korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. Eri fenoliyhdisteiden pitoisuudet on esitetty milligrammana yhdistettä grammassa kuivattua kuorta.

Taulukko 1. Tavallista liuotinuuttoa käyttäen optimiolosuhteissa saadut appelsiininkuoren eri fenoliyhdisteiden pitoisuudet

Flavonoidit	Pitoisuus ⁴ [mg/g kuivattua kuorta] 50 % asetoni	Pitoisuus ⁵ [mg/g uutetta] 70 % etanoli	Pitoisuus ⁵ [mg/g uutetta] 70 % asetoni
<u>Flavonit:</u>			
Luteoliini	-	0,301	0,516
Apigeniini	-	0,175	0,311
Viteksiini	-	0,108	0,226
<u>Flavonolit:</u>			
Rutiini	1,254	0,029	0,022
<u>Flavanolit:</u>			
Katekiini	3,038	0,574	0,572
Epigallokatekiini	-	0,436	0,447
Fenolihapo			
<u>Hydroksibentsoehappo-</u> <u>johdannaiset:</u>			
Protokatekiinihapo	-	0,121	0,112
<i>p</i> -Hydroksibentsoehappo	-	0,073	0,051
Gallushappo	0,085	0,043	0,034
<u>Hydroksikanelihappo-</u> <u>johdannaiset:</u>			
Klorogeenihappo	1,536	-	-
Ferulahappo	1,227	0,404	0,918
Kahvihappo	0,772	0,243	0,266
<i>p</i> -Kumaarihapo	0,046	-	-

Nayakin tutkimusryhmän tulosten lisäksi taulukossa 1 on esitetty S. S. Liewin tutkimusryhmän⁵ appelsiinin koko kuoren fenoliyhdisteille suorittaman tutkimuksen tulokset. Sama tutkimus suoritettiin useilla eri uuttoliuotinseoksilla, joista kahden elintarvikelaatuisen liuotinseoksen tulokset on raportoitu taulukossa. Näistä ensimmäisessä käytettiin uuttoliuottimena 70 % etanoli-vesiseosta ja toisessa vastaavasti 70 % asetoni-vesiseosta. Esikäsittelynä pestyä kuorta kuivattiin 60 °C:ssa 72 tunnin ajan, jonka jälkeen kuivattu kuori jauhettiin partikkelikokoon 0,1-0,5 mm. Kuorijauhetta uutettiin 72 tuntia huoneenlämpötilassa massa-tilavuussuhteella 1:25 (g/ml) kaksi uuttokertaa. Saadut uutteen suodatettiin Whatman No 1. suodatinpaperilla ja niistä haihdutettiin liuotin pois pyöröhaihduttimella 37 °C:ssa. Dimetyylisulfoksidiin (DMSO) liuotettujen uutteen fenolihapot analysoitiin HPLC-menetelmällä ja flavonoidit vielä korkeampaa painetta käyttävällä UPLC-menetelmällä. Liewin tutkimusryhmän tuloksissa fenoliyhdisteiden pitoisuudet on esitetty milligrammana yhdistettä grammassa kuoriuutetta.

Nayakin tutkimusryhmän analysoimat fenoliyhdisteiden pitoisuudet ovat kauttaaltaan suurempia kuin Liewin tutkimusryhmän saamat pitoisuudet. Tutkimusryhmien väliset tulokset eivät kuitenkaan ole vertailukelpoisia keskenään, sillä Nayakin tutkimuksessa fenolipitoisuudet on ilmoitettu kuivatun kuoren pitoisuuksina, kun taas Liew on ilmoittanut pitoisuudet itse uutteen eri fenolimäärinä.^{4,5} Liewin analysoimat fenolipitoisuudet ovat siten vertailukelpoisia keskenään. Tutkimuksessa eri yhdisteiden pitoisuudet vaihtelevat hieman uuttoliuottimien välillä. Flavonoideista flavonien kohdalla asetoni-vesiseoksen pitoisuudet olivat jokaisen yhdisteen kohdalla hieman suurempia kuin vastaavat pitoisuudet etanoli-vesiuutossa. Muiden flavonoidien kohdalla vastaavaa ei havaita. Fenolihapoista hydroksibentsoehappojohdannaisien pitoisuudet uutteenä ovat hieman suurempia etanoli-vesiliuotinseosta käytettäessä ja vastaavasti hydroksikanelihappojohdannaisien pitoisuudet ovat suurempia asetoni-vesiliuotinseosta käytettäessä.⁵

Liewin tutkimusryhmän tuloksissa hydroksikanelihappojohdannaisia eli ferulahappoa ja kahvihappoa löydettiin kuoriuutteesta muita eli hydroksibentsoehappojohdannaisia enemmän. Myös Nayakin tutkimusryhmän tuloksissa nämä sekä kolmas hydroksikanelihappojohdannaisiin kuuluva klorogeenihappo esiintyivät kuorella suurimmilla pitoisuuksilla. Flavonoideista erityisesti flavanolit katekiini ja epigallokatekiini erottuvat tarkastelluissa tutkimuksissa suuremmilla pitoisuuksilla. Lisäksi etenkin 70 % asetoni-vesi-uuttoliuotinseosta käytettäessä flavoneihin kuuluva luteoliini erottui pitoisuudellaan.⁵ Tarkastelluissa tutkimuksissa, ei tavallista liuotinuuttoa käyttäen oltu analysoitu kuoren flavanonien ja niiden glykosidien pitoisuuksia. Fenoliyhdisteiden suurimmaksi kokonaispitoisuudeksi Liewin tutkimusryhmä sai 70 % asetoni-vesiuuttoliuotinseosta käyttäen 38,24 mg GAE/g kuivattua kuorta.⁵ Nayakin tutkimusryhmän fenoliyhdisteiden kokonaispitoisuus oli huomattavasti pienempi, vain 10,21 mg GAE/g kuivattua kuorta.⁴ GAE tarkoittaa gallushappoekvivalenttia eli fenoliyhdisteiden kokonaispitoisuutta verrataan gallushappostandardin arvoon. Liew tutkimusryhmineen olivat selvittäneet myös flavonoidien kokonaispitoisuuden, joka 70 % asetoni-vesiliuotinseosta käyttäen oli 5,03 mg CE/g kuivattua kuorta. CE tarkoittaa vastaavasti katekiiniekvivalenttia eli flavonoidien kokonaispitoisuutta verrataan katekiinistandardin arvoon.⁵ Fenoliyhdisteiden ja etenkin flavonoidien kokonaispitoisuudet vaihtelevat paljon eri tutkimuksien välillä, joten todellisia pitoisuuksia on vaikea selvittää. Esimerkiksi eräässä K. A. Sir Elkhathimin tutkimusryhmän²¹ tutkimuksessa flavonoidien kokonaispitoisuudeksi tavallisella kiinteä-nesteuutolla, etanolia uuttoliuottimena käyttäen, saatiin jopa 83,3 mg CE/g kuorta.

Tavallisen liotinuuton rinnalle on kehitetty uusia uuttomenetelmiä, jotka ovat ympäristöystävällisempiä, energiaa ja liuottimia säästäviä sekä korkeampia saantoja tuottavia. Näitä uusia menetelmiä ovat muiden muassa ultraääniavusteinen ja mikroaaltoavusteinen uutto.⁴ Tavallista liotinuuttoa käytetään lähinnä bioaktiivisten aineiden pienimuotoiseen uuttamiseen ja uudet uuttotekniikat ovat suuremman mittakaavan teollisuudessa käytännöllisempiä.⁵

3.2. Ultraääniavusteinen uutto

Ultraääniavusteisen uuton avulla voidaan nopeuttaa niiden luonnontuotteiden uuttamista, jotka tavallisella uuttomenetelmällä tarvitsevat usean tunnin uuttoajan. Uutossa appelsiininkuorimateriaalin soluissa olevaan nesteeseen muodostuu ultraäänen vaikutuksesta kavitaatiokuplia. Nämä kavitaatiokuplat saavat aikaan solujen turpoamista sekä soluseinämien hajoamista. Ensimmäisessä tapauksessa yhdisteiden diffuusionopeus ulos soluista kasvaa ja toisessa tapauksessa solun sisältö vapautuu soluseinän hajotessa. Kavitaatiovaikutus siis helpottaa uutettavien yhdisteiden vapautumista ja parantaa massansiirtoa häiritsemällä kuoren soluseiniä. Ultraääntä käyttämällä voidaan yksinkertaisella käsittelyllä saada muutamassa minuutissa hyvin toistettavia fenolipitoisuuksia eri yhdisteille. Lisäksi ultraäänen käytön on todettu vähentävän fenoliyhdisteiden eristämiseen tarvittavan uuttoliuottimen määrää ja siten pienentävän liuotinkulutusta. Tässä menetelmässä on liuottimen ja lämpötilan lisäksi optimoitava ultraäänisovellusmuuttujat, joita ovat taajuus sekä sonikaatioaika ja -teho. Lisäksi ultraääniavusteista uuttoa suunniteltaessa pyritään optimoimaan ultraääniaaltojen jakautuminen uuttolaitteistossa ja siten uutettavassa kuori-liuotinseoksessa.⁹

Taulukossa 2 on esitetty ultraääniavusteisen uuton avulla määritettyjen flavonoidien ja fenolihappojen pitoisuudet optimiolosuhteissa. Ensimmäisenä on esitetty samaisen Nayakin tutkimusryhmän ultraääniavusteisella uutolla saamat polyfenolipitoisuudet. Appelsiininkuoren esikäsittely tehtiin kuten tavallisen kiinteä-nesteuuton kohdalla. Uuttoliuottimena ultraääniavusteisessa uutossa käytettiin 75,79 % asetoni-vesiseosta. Kuorijauheen ja liuottimen suhde uutossa oli 1:50 (g/ml). Ultraäänituotto suoritettiin taajuudella 20 kHz. Uuttoaika oli 8,33 minuuttia ja uuttoamplitudi 65,94 %. Lämpötila pidettiin välillä 27 ± 2 °C kierrättämällä kylmää vettä ulkoisessa kylmävesihauteessa. Saatu uute suodatettiin Büchner-suodatuksella ja analysoitiin HPLC-menetelmällä. Fenoliyhdisteiden pitoisuudet on ilmoitettu milligrammana yhdistettä grammassa kuivattua kuorta.⁴

Taulukko 2. Ultraääniavusteista uuttoa käyttäen optimiolosuhteissa saadut appelsiininkuoren eri fenoliyhdisteiden pitoisuudet

Flavonoidit	Pitoisuus ⁴ [mg/g kuivattua kuorta]	Pitoisuus ⁶ [mg/g tuoretta kuorta]	Pitoisuus ²² [mg/g tuoretta kuorta]
<u>Flavanonit:</u>			
Hesperidiini	-	1,130	2,052
Hesperetiini	-	0,012	-
Naringiini	-	0,004	0,703
<u>Flavonit:</u>			
Apigeniini	-	0,001	-
<u>Flavonolit:</u>			
Rutiini	0,983	0,028	-
Kversetiini	-	0,002	-
<u>Flavanolit:</u>			
Katekiini	0,985	0,092	-
Fenolihapot			
<u>Hydroksibentsoehappo-</u> <u>johdannaiset:</u>			
Gallushappo	0,211	0,030	
Protokatekiinihappo	-	0,014	-
<u>Hydroksikanelihappo-</u> <u>johdannaiset:</u>			
Klorogeenihappo	1,442	0,008	-
Ferulahappo	0,769	0,074	-
Kahvihappo	0,503	0,021	-
<i>trans</i> -Kanelihappo	-	0,001	-
<i>p</i> -Kumaarihappo	0,171	0,021	-

Toisena taulukossa 2 on esitetty A. Montero-Calderon tutkimusryhmän⁶ tulokset espanjalaisen Navel -appelsiinilajikkeen koko kuoren fenoliyhdisteiden analyysille. Tässä tutkimuksessa esikäsittelynä tuore kuori pilkottiin partikkelikokoon 6 mm. Ultraääniavusteisen uuton aikana lämpötila pidettiin jäähauteen avulla alle 40 °C:ssa. Pilkotun kuoren ja liuottimen suhde uutossa oli 1:10 (g/ml). Optimiolosuhteiksi uutolle tutkimuksessa määritettiin 50 % etanoli-vesiliuotinseos, 400 W:n ultraääniteho sekä 30 minuutin sonikaatioaika. Myös tässä tutkimuksessa uutteen fenoliyhdisteet analysoitiin HPLC-menetelmällä. Fenoliyhdisteiden pitoisuudet on ilmoitettu milligrammana yhdistettä grammassa tuoretta kuorta.

Viimeisenä taulukossa 2 esitetyssä M. K. Khan tutkimusryhmän²² tutkimuksessa kuorimateriaalina käytettiin espanjalaisen appelsiinin koko kuorta, jota oli säilötty pakastettuna -20 °C:ssa. Esikäsittelyssä pilkottujen kuoripalojen optimaaliseksi kooksi valittiin 2,0 cm². Pilkotun kuoren ja

uuttoliuottimen suhde oli tässä tutkimuksessa 1:4 (g/ml). Optimiolosuhteiksi uutolle määritettiin 40 °C:een lämpötila, 80 % etanoli-vesiliuotinseos sekä 150 W:n ultraääniteho. Laitteiston kaksikerroksisen vaipan väliaineen lämpötila pidettiin vakiona jäähdytys-/lämmitysjärjestelmän avulla. Ultraäänituutto suoritettiin tutkimuksessa taajuudella 20 kHz ja uuttoaika oli 60 minuuttia. Uute analysoitiin HPLC-menetelmällä ja fenoliyhdisteiden pitoisuudet on ilmoitettu milligrammana yhdistettä grammassa tuoretta kuorta.

Nayakin tutkimusryhmän tuloksissa fenoliyhdisteiden massoja on verrattu kuivatun kuoren massaan, kun taas Montero-Calderon ja Khanin tutkimusryhmien tuloksissa vastaava vertaus on tehty tuoreen eli kostean kuoren massaan. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että ensimmäisessä tutkimuksessa esikäsittelyssä haihdutettu kosteus on mukana toisen ja kolmannen tutkimuksen kuorijätteiden massassa, johon fenolimääriä verrataan.^{4,6,22} Tämä on oletettavasti pääasiallisena syynä siihen, miksi ensimmäisen tutkimuksen fenolipitoisuudet ovat muihin verrattuna huomattavasti suurempaa suuruusluokkaa. Lisäksi kuivatuksen on havaittu kasvattavan kuorimatriisin huokoisuutta ja siten helpottavan fenoliyhdisteiden vapautumista uuttamisen aikana, mikä osaltaan kasvattaa ensimmäisen sarakkeen pitoisuuksia.⁹ Fenoliyhdisteiden kokonaispitoisuudeksi ultraäänituutolla Nayak tutkimusryhmineen saivat 10,35 mg GAE/g kuivattua kuorta.⁴

Montero-Calderon ja Khanin tutkimusryhmien tuloksissa flavanoneihin kuuluvan hesperidiinin määrä kuoressa on paljon muita fenoliyhdisteitä suurempi. Khanin tutkimusryhmän tuloksissa myös toista flavanonia, naringiinia oli saatu uutettua huomattavasti enemmän verraten Montero-Calderon tutkimusryhmän tuloksiin. Vastaavasti Montero-Calderon tutkimusryhmineen määritti hesperidiinin jälkeen suurimmille pitoisuuksille flavanoleihin kuuluvan katekiinin, joka myös Nayakin tutkimusryhmän tuloksissa esiintyi hieman rutiinia suuremmalla pitoisuudella. Fenolihappojen kohdalla Nayakin tutkimusryhmän tuloksissa havaitaan sama trendi kuin tavallisen kiinteä-nesteuuton tuloksissa eli hydroksikanelihappojohdannaisten pitoisuudet ovat hydroksibentsoehappojohdannaisten pitoisuuksia suurempia. Montero-Calderon tutkimusryhmän tuloksissa vastaavaa trendiä ei täysin havaita. Kuitenkin myös tässä tutkimuksessa suurimmalla pitoisuudella esiintyvä ferulahappo kuuluu hydroksikanelihappojohdannaisiin.^{6,22}

3.3. Mikroaaltoavusteinen uutto

Mikroaaltoavusteisessa uutossa uuttoprosessia kiihdytetään mikroaaltoenergian avulla. Sähkömagneettinen mikroaaltosäteily aiheuttaa tavanomaiseen johtumiseen perustuvaan

lämmitykseen verrattuna nopeamman lämpötilan nousun itse kuorimatriisissa, jolloin appelsiininkuoren soluseinien sisäinen paine kasvaa ja solut repeytyvät.²³ Polaariset uuttoliuottimen ja kuoren molekyylit ovat mikroaaltokäsittelyn aikana muuttuvassa sähkökentässä, jolloin ne pyrkivät aina orientoitumaan sähkökentän suuntaisesti (dipole rotation). Tällöin molekyylit törmäilevät toisiinsa, mikä aiheuttaa kitkaa ja siten lämpötilan nousua. Lämpötilan nousu vastaavasti aiheuttaa paineen kasvua sekä vetysidosten katkeamista.⁹ Tämän fysikaalisen muutoksen johdosta hedelmäkudosmatriisin huokoisuus paranee, jolloin uuttoliuotin pääsee paremmin tunkeutumaan kudokseen ja fenoliyhdisteiden talteenotto helpottuu.²³ Tämän menetelmän optimoimiseksi on otettava huomioon seuraavat muuttujat: liuotintyyppi sekä käytetty teho ja uuttoaika. Lisäksi laitteiston tyyppi vaikuttaa siihen, miten mikroaaltosäteily kohdistuu tutkittavaan seokseen.⁹

Taulukossa 3 on esitetty mikroaaltoavusteisen uuton avulla määritettyjä flavonoidien ja fenolihappojen pitoisuuksia. Ensimmäisenä on esitetty samaisen Nayakin tutkimusryhmän tulokset mikroaaltoavusteiselle uutolle. Appelsiininkuoren esikäsittely sekä uutteen suodatus tehtiin kuten kiinteä-nesteuuton ja ultraäänituuton kohdalla. Uutossa laitteistona käytettiin tavallista kaupallista (domestic) mikroaaltouunia. Optimaaliseksi olosuhteiksi uutolle määritettiin 51 % asetoni-vesiliuotinseos, 500 W:n teho ja 122 sekunnin uuttoaika. Kuorijauhe uutettiin massatilavuussuhteella 1:25 (g/ml). HPLC-menetelmällä analysoidut fenolipitoisuudet on esitetty milligrammana yhdistettä grammassa kuivattua kuorta.⁴

Taulukko 3. Mikroaaltoavusteista uuttoa käyttäen optimiolosuhteissa saadut appelsiininkuoren eri fenoliyhdisteiden pitoisuudet

Flavonoidit	Pitoisuus ⁴ [mg/g kuivattua kuorta]	Pitoisuus ²³ [mg/g kuivattua kuorta]
<u>Flavanonit:</u>		
Neohesperidiini	-	11,376
Hesperidiini	-	6,904
Naringiini	-	0,837
Didymin	-	0,681
Eriositriini	-	0,354
Narirutiini	-	0,085
<u>Polymetoksyloidut flavonit:</u>		
Nobiletiini	-	0,743
Sinensetiini	-	0,408
Tangeretiini	-	0,101
5,6,7,3',4',5'- Heksametoksisflavoni	-	0,091
<u>Flavonolit:</u>		
Rutiini	0,589	-
<u>Flavanolit:</u>		
Katekiini	2,504	-
Fenolihapot		
<u>Hydroksibentsoehappo- johdannaiset:</u>		
Gallushappo	0,143	-
<u>Hydroksikanelihappo- johdannaiset:</u>		
Ferulahappo	1,455	-
Klorogeenihappo	1,388	-
Kahvihappo	0,816	-
<i>p</i> -Kumaarihappo	0,125	-

Taulukon 3 toisessa tutkimuksessa N. M'hiri tutkimusryhmineen²³ käyttivät tunisialaisen Maltese-appelsiinilajikkeen koko kuorta. Pestyä kuorta oli säilötty pakasteena -80 °C:ssa. Esikäsiteltyä kuori kuivattiin kylmäkuivauksella, -50 °C:ssa 0,001 mbar paineessa, 72 tunnin ajan sekä jauhettiin partikkelikokoon noin 0,315 mm. Esikäsitelty kuori varastoitiin vakuumpakkauksissa 4 °C:ssa. Uutossa laitteistona käytettiin tutkimuskäyttöön tarkoitettua mikroaaltolaitteistoa. Uuton optimiolosuhteiksi määritettiin 80 % etanoli-vesiliuotinseos, 200 W:n teho sekä 180 sekunnin uuttoaika. Tässä tutkimuksessa kuorijauheen ja liuottimen suhde oli 1:10 (g/ml). Huoneenlämpöinen uute sentrifugoitiin, suodatettiin Millipore-paperin lävitse ja analysoitiin HPLC-

menetelmällä. Flavonoidipitoisuudet on ilmoitettu milligrammana yhdistettä grammassa kuivattua kuorta.

M'hiri tutkimusryhmineen käyttivät uutossa tutkimuskäyttöön tarkoitettua mikroaaltouuttolaitteistoa, kun taas Nayak tutkimusryhmineen käyttivät tavallista mikroaaltouunia. Näistä tutkimuskäyttöön tarkoitetulla laitteistolla voidaan oletettavasti saada luotettavampia tuloksia. Nayakin ja M'hirin tutkimusryhmien tutkimuksissa appelsiininkuoresta eristettiin kuitenkin täysin eri fenoliyhdisteitä, eikä tuloksia siksi voida verrata keskenään. M'hiri tutkimusryhmineen analysoivat vain kuoren flavonoideja. Muista tarkastelluista tutkimuksista poiketen tässä tutkimuksessa tarkasteltiin myös PMF-yhdisteiden pitoisuuksia. PMF-yhdisteistä nobiletiinia esiintyi kuoressa suurimmalla pitoisuudella. Flavanoneihin kuuluvat hesperidiini ja neohesperidiini erottuivat tutkimuksessa huomattavasti muita flavonoideja suuremmilla pitoisuuksilla. Nayakin tutkimusryhmän tuloksissa jatkui vastaava trendi kuin aikaisempien menetelmien kohdalla. Katekiini esiintyi flavonoideista suurimmalla pitoisuudella ja fenolihapoista vastaavasti hydroksikanelihappojohdannaiset. Fenoliyhdisteiden kokonaispitoisuudeksi mikroaaltoavusteisella uutolla Nayak tutkimusryhmineen sai 12,09 mg GAE/g kuivattua kuorta.^{4,23}

3.4. Yhteenveto uuttomenetelmistä

Sekä ultraääni- että mikroaaltoavusteisen uuton tutkimuksissa flavonoidi hesperidiini esiintyy kuoressa suurella pitoisuudella. Flavanoniglykosideihin, tarkemmin rutinosideihin, kuuluva hesperidiini onkin sovellutusten kannalta tärkein ja suurimmilla pitoisuuksilla kuoriuutteesta eristetty fenoliyhdiste.¹⁶ Lisäksi flavanoneihin kuuluvaa naringiinia, flavonoleihin kuuluvaa rutiinia ja flavanoleihin kuuluvaa katekiinia saatiin uutettua kuoresta suurilla pitoisuuksilla kaikilla uuttomenetelmillä. Fenolihapoista taas hydroksikanelihappojohdannaisiin kuuluvat klorogeenihappo, ferulahappo sekä kahvihappo esiintyivät jokaisen uuttomenetelmän kohdalla suurimmilla pitoisuuksilla. Siitä, mitkä ovat eri fenoliyhdisteiden todelliset pitoisuudet tai mikä menetelmä sopii parhaiten kullekin yhdisteelle, on vaikea saada yksiselitteistä käsitystä, sillä pitoisuusyksiköt ja pitoisuudet vaihtelevat paljon myös saman uuttomenetelmän eri tutkimusten välillä. Uuttomenetelmän lisäksi fenoliyhdisteiden pitoisuuksiin vaikuttaa useat eri muuttujat appelsiinin alkuperästä ja kasvatusolosuhteista uutto-olosuhteisiin ja analyysimenetelmiin saakka. Esimerkiksi kasvumaata, sadonkorjuuaikaa tai edes appelsiinilajiketta ei tarkastelluissa tutkimuksissa aina mainittu. Nayak tutkimusryhmineen suoritti tutkimuksen samalle kuorimateriaalille kaikilla mainituilla uuttomenetelmillä, jolloin on mahdollista arvioida tutkimuksen fenoliyhdisteille parhaiten sopivia uuttomenetelmiä pitoisuuksien perusteella.

Flavonoideista katekiinille sekä rutiinille parhaaksi uuttomenetelmäksi osoittautui tavallinen kiinteä-nesteuutto. Vastaavasti pienimmät pitoisuudet katekiinille saatiin ultraääniavusteisella uutolla ja rutiinille mikroaaltoavusteisella uutolla. Keskeisistä fenolihapoista klorogeenihapolle parhaaksi menetelmäksi osoittautui tavallinen kiinteä-nesteuutto. Ferulahapolle ja kahvihapolle parhaaksi menetelmäksi osoittautui mikroaaltoavusteinen uutto, kun taas klorogeenihapolle saatiin pienimmät pitoisuudet tällä menetelmällä. Ferulahappo ja kahvihappo vuorostaan suosivat vähiten ultraääniavusteista uuttua.⁴

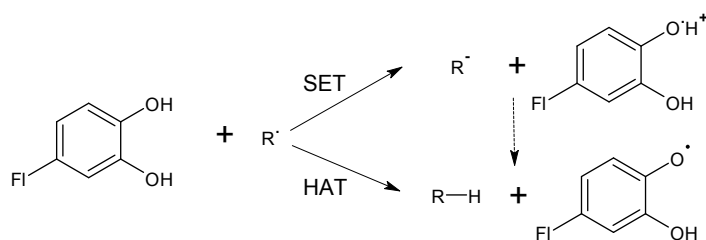
Suurin kokonaisfenolipitoisuus saatiin menetelmistä mikroaaltoavusteisen uuton avulla. Pienin kokonaisfenolispitoisuus saatiin vastaavasti tavallisella kiinteä-nesteuutolla.⁴ Menetelmistä kiinteä-nesteuutto on kuitenkin ehdottomasti perinteisin ja käytetyin sitrushedelmien kuoren fenoliuutoissa.⁹ Toimintaperiaatteeltaan tämä on varmasti menetelmistä yksinkertaisin mutta samalla aikaa vievin. Uudet ultraääni- ja mikroaaltoavusteiset menetelmät sisältävät enemmän muuttujia ja ovat hyvin tehokkaita.⁴ Yksi tällainen uuton tehokkuutta määrittävä tekijä on ehdottomasti se, kuinka paljon uuttoliuotinta tarvitaan erottamaan fenoliyhdisteet. Myös appelsiininkuoren ja uuttoliuottimen suhde vaihteli paljon saman menetelmän eri tutkimusten välillä. Tarkastelluissa tutkimuksissa kiinteä-nesteuutossa kuoren ja liuottimen suhde oli parhaimmillaan 1:25 (mg/l). Mikroaaltoavusteisen uuton tutkimuksissa vastaava massa-tilavuussuhde oli parhaimmillaan 1:10 (mg/l) ja ultraääniavusteisen uuton tutkimuksissa jopa 1:4 (mg/l). Avustetuissa menetelmissä tarvittavat liuotinmäärät ovat siis huomattavasti tavallista kiinteä-nesteuuttoa pienempiä, mikä tukee havaintoa avustettujen menetelmien tehokkuudesta. Esimerkiksi ultraääniavusteisen uuton tapauksessa fenoliyhdisteiden eristämiseen tarvittava liuotinmäärä on vain noin kuudesosa kiinteä-nesteuutossa tarvittavan uuttoliuottimen määrästä.^{5,22,23} Ongelmana näissä avustetuissa menetelmissä voi kuitenkin olla liian ankarat uutto-olosuhteet herkimmille fenoliyhdisteille.⁴

4. FENOLISTEN UUTEAINEIDEN ANTIOKSIDANTTISUUS

4.1. Antioksidanttisuus

Polyfenolit ovat tärkein kasveissa esiintyvien, biologisesti aktiivisten ja terveyshyötyjä omaavien fytokemikaalien ryhmä. Niiden terveyttä edistävät vaikutukset perustuvat antioksidanttiseen aktiivisuuteen. Tärkeimmät antioksidanttiset vaikutukset taas perustuvat fenolisten yhdisteiden kykyyn tuhota vapaita radikaaleja, katkaista radikaalien ketjureaktiot sekä toimia metallien kelatoijina.⁴ On havaittu, että reaktiiviset happiradikaalit (ROS), kuten vetyperoksidi (H_2O_2), hypokloorihapoke (HOCl) ja hydroksyyli-radikaali (HO^\bullet) tukevat ihmisten patogeneesiä eli taudin syntyä. Vapaiden radikaalien välittämiä sairauksia, joita fytofenolit voivat tehokkaasti hoitaa ja ehkäistä, ovat esimerkiksi diabetes, syöpä, aivoja rappeuttavat sairaudet, ikääntymisprosessi sekä sydän- ja verisuonihäiriöt. Lisäksi antioksidanttiominaisuudesta johtuvia biologisia terveysvaikutuksia ovat muun muassa antiviraaliset, -bakteeriset ja -allergiset sekä verihyytymiä ehkäisevät ja verisuonia laajentavat vaikutukset.¹⁴

Antioksidantit voivat deaktivoida radikaaleja kahden eri päämekanismin avulla. Se kumpaa mekanismia antioksidantti käyttää, riippuu yhdisteen rakenteesta ja ominaisuuksista. Antioksidanttimolekyylit voivat reagoida myös molempien mekanismien kautta. HAT-menetelmässä (hydrogen atom transfer) eli vetyatomien siirrossa antioksidantti luovuttaa vetyatomeja vapaiden radikaalien stabiloimiseksi, jolloin ne eivät voi edetä radikaalien reaktioissa. SET-menetelmässä (single electron transfer) eli yhden elektronin siirrossa antioksidantti luovuttaa elektronin vapaalle radikaalille, jolloin niiden määrä vähenee.⁵ Kuvassa 3 on kuvattu molempien menetelmien deaktivointireaktiot antioksidantin avulla.^{24,25} Kuvan esimerkkireaktioissa antioksidanttina toimii flavonoidi, jonka aromaattisen renkaan hydroksyyli-ryhmä reagoi radikaalin kanssa. Reaktioissa muodostuu antioksidanttiradikaaleja, kun hydroksyyli-ryhmän happiatomille jää vapaa elektroni. Itse antioksidantti ei kuitenkaan toimi radikaalina, sillä antioksidanttiradikaalin rakenteessa tapahtuu vapaan elektronin delokalisaatio aromaattiseen renkaaseen.²⁶

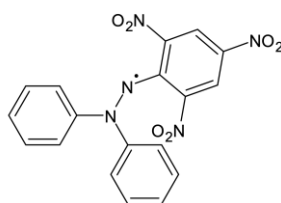


Kuva 3. Radikaalin deaktivointi flavonoidilla HAT-menetelmän eli vetyatomien siirron sekä SET-menetelmän eli yhden elektronin siirron avulla

Fenolisten yhdisteiden, erityisesti flavonoidien, antioksidanttivaikutus riippuu niiden rakenneominaisuuksista, kuten fenolisten hydroksyylien lukumäärästä ja sijainnista, yhdisteen muista funktionaalisista ryhmistä sekä konjugaatiosta.⁸ Glykosylaation on todettu vähentävän ja vastaavasti hydroksylaation ja hydroksyyli ryhmien määrän kasvun parantavan antioksidanttisuutta. Tämä johtuu siitä, että hydroksyyli ryhmien vetyatomit osallistuvat vapaiden radikaalien tuhoamiseen ja mikäli rakenteen hydroksyyli ryhmä on glykosyloitunut, tulee siitä käyttökelvoton osallistumaan tähän vetyatomin kautta tapahtuvaan tuhoamisreaktioon. Lisäksi C-2 ja C-3-asemien välisen kaksoissidoksen konjugaation C-4-aseman karbonyyli ryhmän kanssa on todettu parantavan antioksidanttisuutta. Tällöin syntyy konjugaatio flavonoidin aromaattisten renkaiden välille, jolloin pariton elektroni delokalisoituu laajemmalle alueelle ja flavonoidiradikaalista tulee siten stabiilimpi.²⁷

4.1.1. Antioksidanttiaktiivisuuden määrittäminen

Appelsiininkuoriuutteen komponenttien antioksidanttisen aktiivisuuden määrittämiseen on kehitetty lukuisia eri menetelmiä. Kuoriuutteen antioksidanttiaktiivisuus voidaan määrittää esimerkiksi seuraavien kolmen eri menetelmän avulla. FRAP-menetelmä (ferric reducing antioxidant power) mittaa antioksidanttiaktiivisuutta SET-mekanismin kautta, kun taas ORAC-menetelmä (oxygen radical absorbance capacity) HAT-mekanismin kautta. DPPH-radikaalin eli 2,2-difenyyl-1-pikryylihydratsyylin (**27**) avulla tapahtuvassa määrittämisessä antioksidanttiaktiivisuus määrittyy molempien menetelmien kautta. Näin ollen määritetty antioksidanttikapasiteetti riippuu paljon uuteainekoostumuksesta sekä kapasiteetin määrittämisessä käytetystä menetelmästä ja olosuhteista.⁵

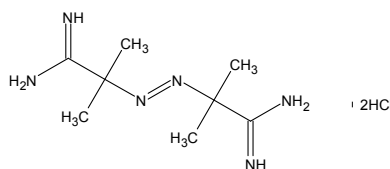


27

DPPH-menetelmä mittaa vapaiden radikaalien poistoaktiivisuutta.⁵ Menetelmässä tutkitun yhdisteen tai uutteen annetaan reagoida stabiilin DPPH-radikaalin kanssa metanoliliuoksessa. DPPH-radikaalin ja antioksidantin välisessä reaktiossa DPPH[•] sieppaa antioksidantilta vedyn, jolloin vuorostaan antioksidantista tulee radikaali. Vety on peräisin fenoliyhdisteen OH-ryhmältä. Toisaalta DPPH-radikaali voi reagoida myös toisen radikaalin kanssa. DPPH-radikaalin vähenemistä tutkitaan spektrofotometrisesti ja antioksidanttiaktiivisuus määritetään mitattujen

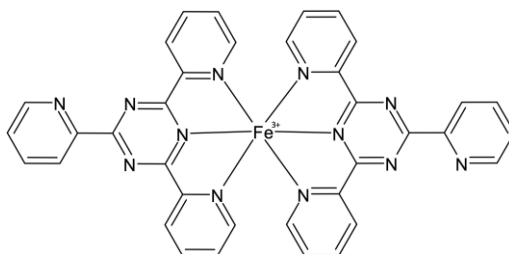
absorbanssien avulla. DPPH[•] absorboi normaalisti aallonpituudella noin 515 nm mutta reagoiessaan antioksidantin tai toisen radikaalin kanssa absorptio häviää.²⁶

ORAC-määrittäminen perustuu peroksyyliradikaalien aiheuttaman hapettumisen estämiseen. Peroksyyliradikaalien muodostuminen saadaan aikaan atsoyhdisteiden, kuten AAPH:n eli 2,2'-atso-bis(2-amidinopropaani) dihydrokloridin (**28**) termisellä hajoamisella. Hapettumisvauriot aiheuttavat fluoresoivan molekyylin fluoresenssin menetyksen, mikä voidaan havaita fluoresenssispektrometrillä. Antioksidantit voivat suojata fluoresoivaa molekyyliä peroksyyliradikaalien aiheuttamilta hapettavilta vaurioilta. Suojausaste eli ORAC-arvo voidaan määrittää kvantitatiivisesti fluoresenssispektrometrin fluoresenssikäyrän perusteella. Fluoresoivana molekyylinä käytetään tavallisesti fluoreskeiiniä.²⁸



28

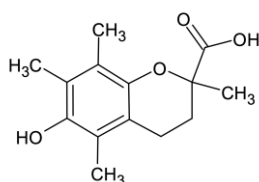
FRAP-menetelmä on kolorimetrinen menetelmä, jossa arvioidaan Fe³⁺-TPTZ -kompleksin (**29**) pelkistymistä muuttamalla se Fe²⁺-TPTZ -muotoon. TPTZ-yhdisteellä tarkoitetaan 2,4,6-tris(2-pyridiyyli)-1,3,5-triaziinia, joita kompleksissa on kaksi kappaletta. Kompleksin pelkistyminen saa aikaan voimakkaan sinisen värin, jonka absorptiomaksimi on aallonpituudella 593 nm. Pelkistimenä toimii antioksidantti, joka luovuttaa elektronin kompleksille. Pelkistymisreaktion ja samalla sinisen värin muodostumisen edellytyksenä on, että antioksidantti on läsnä. Tästä johtuen antioksidantin FRAP-arvo voidaan määrittää mitattujen absorbanssien perusteella.²⁹



29

Taulukossa 4 on esitetty appelsiininkuoresta eristetyin kahden tutkimuksen uutteen antioksidanttiaktiivisuudet näillä eri menetelmillä määritettynä. Ensimmäisenä on esitetty Nayakin

tutkimusryhmän⁴ ja toisena Liewin tutkimusryhmän⁵ antioksidanttiaktiivisuudet kiinteä-nesteuuton uutteelle. Täytyy kuitenkin muistaa, että uutteen antioksidanttivaikutus riippuu paljon sen koostumuksesta ja vaihtelee täten huomattavan paljon eri tutkimuksien välillä. Lisäksi uutteen antioksidanttiaktiivisuuden ilmaisemisessa voidaan käyttää useita eri yksiköitä, mikä tekee tulosten vertailusta entistä haastavampaa. DPPH-menetelmän tapauksessa usein käytetään IC50-arvoa. Arvo kuvaa näytteen pitoisuutta, joka tarvitaan poistamaan puolet DPPH-radikaalista.⁴ DPPH-menetelmän antioksidanttiaktiivisuus voidaan ilmaista myös Trolox-ekvivalentin (TE) avulla. Trolox eli 6-hydroksi-2,5,7,8-tetrametyylikromaani-2-karboksylihappo (**30**) on antioksidanttina toimiva vesiliukoinen vastine E-vitamiinille. Tällöin uutteen antioksidanttikapasiteettia verrataan Trolox-standardin arvoon esimerkiksi muodoissa mg TE/g uutetta tai mol TE/g uutetta. Useimmiten Trolox-ekvivalenttia käytetään kuitenkin ORAC-arvon ilmaisussa. FRAP-arvo taas ilmaistaan hapetusluvulla kaksi esiintyvän raudan eli Fe(II):n pitoisuutena näytegrammaa kohden.⁵



30

Taulukko 4. Kuoriuutteiden antioksidanttiaktiivisuudet DPPH-, ORAC- ja FRAP-menetelmillä määritettynä

DPPH	ORAC	FRAP
358,456 (IC50, ml uutetta/l) ⁴	523,04 (μM TE/g uutetta) ⁴	-
18,20 (mg TE/g uutetta) ⁵	0,92 (mol TE/g uutetta) ⁵	296,61 (mmol Fe(II)/g uutetta) ⁵

Appelsiininkuoren flavonoidien erilaisia biokemiallisia toimintoja on tutkittu viime aikoina laajasti. Esimerkiksi naringiinilla, hesperidiinilla ja hesperetiinilla on estäviä vaikutuksia vapaiden happiradikaalien tuotantoon.¹⁶ On todettu, että appelsiininkuoren korkea antioksidanttikapasiteetti liittyy erityisesti sen korkeaan hesperidiinipitoisuuteen.⁶

4.2. Lääketeollisuus

Lääketeollisuudessa kuoriuutteen fenoliyhdisteitä, etenkin flavonoideja, on mahdollista hyödyntää kemoprevention ja kemopreventiivisten lääkevalmisteiden kehityksessä. Kemopreventiolla tarkoitetaan luonnollisten yhdisteiden, biologisten aineiden tai synteettisten kemiallisten yhdisteiden

käyttöä sairauksien ehkäisyssä tai tukahduttamisessa, normaalin fysiologisen toiminnan palauttamisessa ja patologisten tilojen varhaisessa havaitsemisessa.^{30,31}

Kemopreventiota voidaan käyttää kolmella eri tavalla syövän ehkäisyssä. Ensisijaisessa ehkäisyssä kemopreventiivistä yhdistettä käytetään syövän estämiseksi terveellä ihmisellä, jolla on korkea syöpäriski. Toissijaisessa ehkäisyssä yhdistettä käytetään estämään esisyöpäalueen kehittyminen syöväksi. Viimeisessä tavassa eli tertiäärisessä ehkäisyssä kemopreventiota käytetään ehkäisemään uuden syövän kehittyminen henkilölle, joka on aiemmin jo sairastanut syövän.³² Sitruhedelmäflavonoideja, kuten hesperidiinia, hesperetiinia ja naringiinia, voidaan käyttää estävinä, tukahduttavina ja muuntavina aineina syövän kemopreventiossa erilaisten mekanismien avulla. Näitä mekanismeja ovat lisääntymisen, tunkeutumisen tai angiogeneesin eli verisuonten uudismuodostuksen estäminen, proapoptoottiset eli ohjattua solukuolemaa edistävät vaikutukset sekä soluselektiivinen myrkyllisyys syöpäsoluissa. Etenkin syöpäsolujen lisääntymisen estämisessä, flavonoidin kemiallinen rakenne vaikuttaa sen toimintaan. Hydroksyyliyhdyntien lukumäärä ja sijainti aromaattisissa renkaissa, metoksiryhmien lukumäärä ja heikosti polaariset tasomaiset rakenteet määrittävät flavonoidin lisääntymistä estävän vaikutuksen.²⁰ Esimerkiksi C-2 ja C-3-asemien välisen kaksoissidoksen sekä aromaattisen renkaan vierekkäisten hydroksyyliyhdyntien määrän lisääntymisen on todettu parantavan estävää vaikutusta.³³ Näiden mekanismien lisäksi flavonoidit voivat syövän synnyn ja etenemisen ehkäisemisessä minimoida DNA-vaurioita.¹⁶ Sitruhedelmäflavonoideilla on todettu olevan kemopreventiivisiä vaikutuksia virtsarakon, paksusuolen, maksan, keuhkojen, eturauhasen, rintarauhasen ja suun syövän kehittymiseen.²⁰

Syövän ehkäisyyn lisäksi sitruhedelmäflavonoideilla, erityisesti appelsiininkuoren hesperetiinilla ja naringiinilla, on kemopreventiivisiä vaikutuksia tulehduksellisten häiriöiden hoidossa. Vapaiden radikaalien tuotannon ja hapettumisenestoaineiden välisen epätasapainon aiheuttama hapetusstressi voi olla osallisena niin syövän kuin tulehduksen synnyssä. Tulehduksen aikana reaktiivisia happiradikaaleja ylituotetaan vaurioituneiden kudosten ja solujen lähellä. Ylituotanto johtaa epätasapainoon ja tulehduksen pahenemiseen.¹⁶ On myös todettu, että pitkittyneellä kroonisella tulehduksella on yhteys eri sairauksiin, kuten 2-typin diabetekseen, sydän- ja verisuonisairauksiin sekä syöpään.²⁰ Antioksidanttisuutensa vuoksi sitruhedelmäflavonoidit kykenevät tuhoamaan ylituotettuja radikaaleja ja ehkäisemään näin tulehdusta, joten näitä flavonoideja voitaisiin käyttää tulehduksellisten sairauksien hoidossa.¹⁶

4.3. Elintarviketeollisuus

Antioksidanteilla on merkittävä rooli myös elintarviketeollisuudessa.^{34,35} Lisääntynyt tutkimus ruokavalion ja elintarvikkeiden komponenttien yhteydestä sairauksien ehkäisyyn ja hoitoon on edistänyt ajatusmallia, jossa ruoka voisi edistää terveyttä.¹⁰ Antioksidanttiaktiivisuuden vuoksi kuorijätteestä uutettuja fenolisia yhdisteitä voidaan käyttää lääkevalmisteiden lisäksi terveysvaikutteisissa ja ravitsemuksellisissa elintarvikkeissa.⁶ Terveysvaikutusten lisäksi antioksidantit estävät lipidien peroksidaatiota, minkä vuoksi niillä on merkittävä rooli elintarvikkeiden pilaantumisen ehkäisemisessä.^{34,35} Näiden antioksidanttivaikutukseen perustuvien käyttökohteiden lisäksi jotkut flavanoniglykosidit, kuten hesperidiini, voidaan muuttaa vastaaviksi dihydrokalkoneiksi, jotka toimivat voimakkaina luonnollisina makeutusaineina.¹⁹

Lääkevalmisteiden lisäksi ruokavalion kautta voidaan saada aikaan kemopreventiivisiä vaikutuksia. Ruokavalion avulla tapahtuvaa kemopreventiota voitaisiin käyttää kroonisten rappeuttavien sairauksien, erityisesti tyypin 2 diabeteksen hallinnassa. Antioksidanttientsyymien ja potentiaalisten antioksidanttitamiinien taso on laskenut diabeetikoilla, mikä heikentää endogeenisen eli elimistön luonnollisen antioksidanttipuolustuksen tasapainoa. Kuten jo aiemmin todettiin, kroonisella tulehduksella on yhteys tyypin 2 diabetekseen. Tärkeitä diabeteksen ja siihen liittyvien lisätautien riskitekijöitä ovat hapetusstressi ja muutokset glukoosiaineenvaihdunnassa.¹⁰ Kehittyneet glykaation lopputuotteet eli AGE:t (advanced glycation end products) ovat erilaisia proteiineja ja lipidejä eli rasvoja, jotka on muodostettu ei-entsymaattisilla glykaatio- ja hapetusreaktioilla.³⁶ AGE:t ja niiden karbonyyli johdannaiset edistävät 2 tyypin diabeteksen syntyä solutasolla ja saavat aikaan hapetusstressin, joka pahentaa diabeettisia komplikaatioita.¹⁰ Yksi tällainen diabetekseen liitetty AGE on glukosepaani.³⁶ Sairautta voidaan lievittää viivästyttämällä tai estämällä glykaatiota, AGE-lopputuotteiden estäjien avulla.¹⁰ Eri flavonoideilla on todettu olevan AGE-lopputuotteita estäviä vaikutuksia. Flavonoidien estävä vaikutus riippuu niiden rakenteellisista ominaisuuksista. Esimerkiksi hydroksyyli ryhmien lisääntyminen C-3', C-5', C-5 ja C-7-asemissa on todettu vahvistavan estävää vaikutusta. Sitrushedelmäflavonoideista esimerkiksi rutiinilla, luteoliinilla ja apigeniinilla on todettu olevan korkea AGE-lopputuotteita estävä vaikutus.³⁷ Nämä luonnolliset AGE-estäjät voivat toimia arvokkaina apuaineina taudin lievittämisessä. Korkeasta fenolipitoisuudesta ja antioksidanttisuudesta johtuen, sitrushedelmäuute onkin erinomainen ehdokas diabeteksen hallintaan tarkoitettujen funktionaalisten elintarvikkeiden, juomien tai ruokien, kehitykselle.¹⁰

Tärkeimmillä sitrushedelmäflavonoideilla, kuten hesperidiinilla ja hesperetiinilla, on antioksidanttivaikutuksen lisäksi kyky kulkea aivo-veriesteren läpi. Tämän vuoksi näillä flavonoideilla on mahdollisuus puuttua neurodegeneraatioon eli hermokudoksen tai -solujen rappeutumiseen ja siten tukea aivojen toimintaa. Lisäksi näiden flavonoidien etuihin kuuluu korkea turvallisuus ja hyötyosuus. Tutkimuksissa on todettu, että näillä sitrushedelmäflavonoideilla on, niin pienillä kuin suurilla annoksilla useita hermostoa suojaavia mekanismeja esimerkiksi hapettavia vaurioita vastaan. Tämän seurauksena näitä flavonoideja sisältävää appelsiininkuoriuutetta voitaisiin hyödyntää hermostoa suojaavien ravintovalmisteiden ja ”aivoruokien” kehittämisessä.²⁰

Elintarvikkeiden, erityisesti lihatuotteiden, pilaantuminen johtuu pääosin radikaalien aiheuttamasta lipidien hapettumisesta ja itsehapettumisesta (autoxidation).³⁵ Itsehapettuminen on hidas radikaaliketjureaktion kautta etenevä prosessi. Ketjureaktio sisältää induktio-, etenemis- ja lopetusvaiheet. Induktiovaiheessa syntyy alkyyliradikaaleja ($R\cdot$), jotka etenemisvaiheen aikana reagoivat happimolekyylien kanssa muodostaen peroksidiradikaaleja ($ROO\cdot$) ja hydroperoksidesia ($ROOH$). Lopetusvaiheessa kaksi radikaalia yhdistyy muodostaen stabiilin adduktin.²⁶ Hapettumisen ehkäisemisessä on käytetty synteettisiä antioksidantteja, joiden on todettu aiheuttavan haittavaikutuksia elintarvikkeen makuun, hajuun, väriin, rakenteeseen tai ravintoarvoon.³⁵ Haittavaikutuksilta voitaisiin välttyä korvaamalla synteettiset antioksidantit turvallisemmalla, vapaiden radikaalien poistovaikutuksen omaavia fenoliyhdisteitä sisältävällä, kuorijauheuutteella.³⁴

5. YHTEENVETO

Polyfenolit ovat biologisesti aktiivisia yhdisteitä, jotka sisältävät useampia fenoliyksiköitä. Fenoliyksiköllä tarkoitetaan aromaattista rengasta, johon on liittynyt vähintään yksi hydroksyyli substituentti. Appelsiininkuoren fenoliyhdisteet voidaan jakaa kahteen luokkaan, fenolihapoihin ja flavonoideihin. Näistä flavonoidit ovat ehdottomasti yleisempiä. Rakenteensa perusteella fenolihapot voidaan jakaa vielä hydroksibentsoehappo- ja hydroksikanelihappojohdannaisiin. Flavonoidit voidaan jakaa vastaavasti flavanoneihin, flavoneihin, flavonoleihin ja flavanoleihin. Appelsiininkuoren polyfenoleilla on useita potentiaalisia sovellutuskohdetta mutta ennen kuin niitä voidaan hyödyntää, täytyy ne saada eristettyä kuorimatriisista.

Polyfenoleja voidaan eristää kuorimatriisista uuttamalla. Uutto on kemiallinen erotusmenetelmä, joka perustuu yhdisteiden erilaisiin liukoisuusominaisuuksiin. Kolme tarkasteltua uuttomenetelmää, joilla fenoliyhdisteitä voidaan eristää ovat tavallinen kiinteä-nesteuutto sekä ultraääniavusteinen ja mikroaaltoavusteinen uutto. Menetelmistä ensimmäinen sopii parhaiten fenoliyhdisteiden pienimuotoiseen uuttamiseen, kun taas jälkimmäiset avustetut menetelmät voisivat olla käytännöllisempiä teollisen mittakaavan eristämiseksi. Kaikilla näillä menetelmillä on tarkasteltujen tutkimusten perusteella saatu samaa suuruusluokkaa olevia fenolipitoisuuksia. Tutkimusten perusteella fenolihapoista hydroksikanelihappojohdannaiset esiintyvät suuremmalla pitoisuudella kuoreissa. Merkittävimpiä hydroksikanelihappojohdannaisia kuoreissa ovat klorogeenihappo, ferulahappo sekä kahvihappo. Flavonoideista puolestaan flavanonit ovat yleisimpiä ja flavanoniglykosidi hesperidiinia saadaankin tarkasteltujen tutkimusten mukaan eristettyä kuoresta suurimmilla pitoisuuksilla. Muita merkittäville pitoisuuksilla kuoreissa esiintyviä flavonoideja ovat flavanoneihin kuuluva naringiini, flavonoleihin kuuluva rutiini ja flavanoleihin kuuluva katekiini.

Fenoliyhdisteillä on havaittu olevan terveyttä edistäviä vaikutuksia, jotka perustuvat niiden kykyyn toimia antioksidantteina. Antioksidanttiset vaikutukset taas perustuvat polyfenolien kykyyn tuhota vapaita radikaaleja, katkaista radikaalien ketjureaktioita sekä toimia metallien kelatoijina. Antioksidanttisuutensa vuoksi appelsiininkuoren polyfenoleja voitaisiin hyödyntää erilaisten lääke- ja elintarviketeollisuuden valmisteiden kehityksessä. Samalla voitaisiin vähentää ympäristön kuormittumista, kun hyödyntämättömän kuorijätteen määrä vähentyisi. Appelsiininkuoren fenoliyhdisteiden ja etenkin sitrushedelmäflavonoidien antioksidanttiaktiivisuuden hyödyntämistä onkin tutkittu laajasti. Tarkastellut tutkimukset keskittyivät kuitenkin joko uutettavien fenoliyhdisteiden talteenoton optimoimiseen ja uutteen antioksidanttiaktiivisuuden määrittämiseen

tai sitrushedelmien fenolihdisteiden antioksidanttivaikutuksen hyödyntämiseen. Tarvitaan lisätutkimuksia siitä, miten käytännössä fenolihdisteitä sisältävästä kuorijätteestä päästään lääke- ja elintarviketeollisuuden tuotteisiin. Tulevaisuuden tutkimuksen kohteita voisivat olla esimerkiksi tutkimukset siitä, minkälainen uuttoprosessi on teollisuuden mittakaavassa käytännöllisin tai miten uutetta tulee käsitellä, jotta siitä saadaan erotettua lopputuotteisiin tarvittavat fenolihdisteet vai voidaanko uutetta hyödyntää sellaisenaan.

6. KIRJALLISUUSVIITTEET

1. Rivas B., Torrado A., Torre P., Converti A., Domínguez J., M., *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2380-2387.
2. Statista. *Citrus production spain 2018/2019, by type*, <https://www.statista.com/statistics/440983/citrus-production-in-spain/> (haettu 18.5.2020).
3. Gómez-Mejía E., Rosales-Conrado N., León-González M. E., Madrid Y., *Food Chem.* **2019**, *295*, 289-299.
4. Nayak B., Dahmoune F., Moussi K., *et al.*, *Food Chem.* **2015**, *187*, 507-516.
5. Liew S. S., Ho W. Y., Yeap S. K., Bin Sharifudin S. A., *PeerJ.* **2018**.
6. Montero-Calderon A., Cortes C., Zulueta A., Frigola A., Esteve M. J., *Sci. Rep.* **2019**, *9*.
7. Anjum S., Vishnu Priya V., Rengasamy G., *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2018**, *9*, 450-453.
8. Anagnostopoulou M. A., Kefalas P., Papageorgiou V. P., Assimopoulou A. N., Boskou D., *Food Chem.* **2006**, *94*, 19-25.
9. M'hiri N., Ioannou I., Ghoul M., Boudhrioua N. M., *Food Rev. Int.* **2014**, *30*, 265-290.
10. Aruoma O. I., Landes B., Ramful-Baboolall D., *et al.*, *Prev. Med.* **2012**, *54*, 12-16.
11. Stalikas C. D., *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 3268-3295.
12. Scalbert A., Williamson G., *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073-2085.
13. Satokausikalenteri. *Marjojen nauttiminen kannattaa*, <https://satokausi.fi/marjojen-nauttiminen-kannattaa/> (haettu 17.5.2020)
14. Rafiq S., Kaul R., Sofi S. A., Bashir N., Nazir F., Ahmad Nayik G., *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2018**, *17*, 351-358.
15. Tripoli E., Guardia M. L., Giammanco S., Majo D. D., Giammanco M., *Food Chem.* **2007**, *104*, 466-479.
16. Yi L., Ma S., Ren D., *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 479-511.
17. Gattuso G., Caristi C., Gargiulli C., Bellocco E., Toscano G., Leuzzi U., *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3929-3935.
18. Li S., Pan M., Lo C., *et al.*, *J. Funct. Foods.* **2009**, *1*, 2-12.
19. Bocco A., Cuvelier M., Richard H., Berset C., *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2123-2129.
20. Hwang S., Shih P., Yen G., *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 877-885.

21. Sir Elkhatim K. A., Elagib R. A. A., Hassan A. B., *Food Sci. Nutr.* **2018**, *6*, 1214-1219.
22. Khan M. K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A., Dangles O., Chemat F., *Food Chem.* **2010**, *119*, 851-858.
23. M'hiri N., Ioannou I., Mihoubi Boudhrioua N., Ghoul M., *Food Bioprod. Process.* **2015**, *96*, 161-170.
24. Ashby E. C., *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 414-421.
25. Mader E. A., Davidson E. R., Mayer J. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5153-5166.
26. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., *LWT - Food Sci. and Technol.* **1995**, *28*, 25-30.
27. Slámová K., Kapešová J., Valentová K., *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*.
28. Zulueta A., Esteve M. J., Frígola A., *Food Chem.* **2009**, *114*, 310-316.
29. Benzie I. F. F., Strain J. J., *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70-76.
30. Tsao A. S., Kim E. S., Hong W. K., *CA Cancer J. Clin.* **2004**, *54*, 150-180.
31. Hirsch F. R., Merrick D. T., Franklin W. A., *Eur. Respir. J.* **2002**, *19*, 1151-1158.
32. OncoLink Team. *What is chemoprevention?*, <https://www.oncolink.org/risk-and-prevention/prevention-screening/what-is-chemoprevention> (haettu 17.5.2020)
33. Benavente-García O., Castillo J., Alcaraz M., Vicente V., Del Río J. A., Ortuño A., *Curr. Cancer Drug Targets.* **2007**, *7*, 795-809.
34. Devatkal S. K., Narsaiah K., Borah A., *Meat Sci.* **2010**, *85*, 155-159.
35. Fernández J., Pérez-Álvarez J. A., Fernández-López J. A., *Food Chem.* **1997**, *59*, 345-353.
36. Reynaert N. L., Gopal P., Rutten E. P. A., Wouters E. F. M., Schalkwijk C. G., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *81*, 403-418.
37. Matsuda H., Wang T., Managi H., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5317-5323.